

ÜBER DIE MÖGLICHKEIT
DER HISTOLOGISCHEN ABSCHÄTZUNG
DER FETTSÄUREKOMPONENTEN
IN DER MYELINSCHIED

WOLFGANG SCHWALBACH

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548324_0014

Aus der Neurologischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof.Dr.Schrader

ÜBER DIE MÖGLICHKEIT DER HISTOLOGISCHEN ABSCHÄTZUNG DER
FETTSÄUREKOMPONENTEN IN DER MYELINSCHNUR

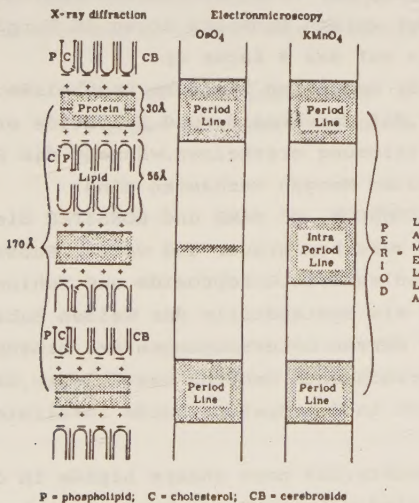
Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Schwalbach
aus
Pürgen
1981

Einleitung

Eine wesentliche Aussage über die Struktur der Myelinscheide gelang SCHMIDT (1936) mit Polarisationsaufnahmen und Röntgendifferenzierungen (SCHMITT, BEAR und PALMER 1941). Aus den Ergebnissen der Polarisationsaufnahmen schloß er auf einen lamellären Aufbau mit abwechselnden Schichten von radiär angelegten Fettsäuremolekülen und circumferentiell liegenden Proteinen.

Diese Erkenntnisse wurden durch seine röntgenanalytischen Arbeiten bestätigt, wobei SCHMIDT (1936) zusätzlich Angaben über die Schichtdicke machen konnte.



2. Comparison of myelin structure obtained from X-ray diffraction and electron-microscopic data.

Lipidkomponenten der Myelinscheide

Die unterschiedliche Verteilung der Fettsäuren in der grauen und weißen Substanz des Gehirnes kann hauptsächlich auf den Lipidgehalt der Myelinscheide zurückgeführt werden. Die vergleichende Analyse der beiden Substanzen bietet somit die Möglichkeit, die Zusammensetzung der Markscheide zu bestimmen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, vor und nach der Myelinisierung die Konzentration der jeweiligen Fettsäure zu bestimmen, so daß man aus einem Anstieg der Konzentration während der Reifungszeit auf einen Einbau in die Markscheide schließen kann.

So fanden SMITH und MAIR (1912-1913) während der Myelinisierung des jungen Gehirns einen plötzlichen Anstieg der Cerebroside, einen leichten Anstieg des Cholesterins, jedoch keine Veränderung der Phosphatidkonzentration. Der Cerebrosidegehalt der weißen Substanz stieg im Vergleich zur grauen Substanz auf das 4 fache an.

KOCH und KOCH (1913) erhielten ähnliche Ergebnisse. Sie konnten nachweisen, daß Cerebroside und Sulfatide erst während der Myelinisierung erscheinen, während die Phosphatide bereits in großen Mengen vorhanden sind.

1948 untersuchten JOHNSON, MC NABB und ROSSITER die Verteilung der Lipide zwischen grauer und weißer Substanz. Dabei erschienen Cholesterin, Cerebroside und Sphingomyelin überwiegend als Bestandteile der weißen Substanz und der peripheren Nerven. Untersuchungen des menschlichen neugeborenen und erwachsenen Gehirns bestätigten, daß diese Lipide hauptsächlich in der Myelinscheide lokalisiert sind (ROSSITER).

BRANTE (1949) entdeckte, daß noch andere Lipide in der Markscheide zu finden sind. Seine Untersuchungen ergaben, daß Cholesterin, Cerebroside, Serin-Kephalin, Plasmalogen, Sphingomyelin und Lecithin in der weißen Substanz in einem Verhältnis von 8:4:2:2:2:1 vorhanden sind. Weiterhin fand er, daß diese Lipide 35% der Markscheide (Frischgewicht) ausmachen.

Genauere Angaben von DAVISON und WAJDA (1962) bestätigen diese Ergebnisse (umseitige Tabelle):

	weiße Substanz	graue Substanz	W/G
Cholesterin	9.40	2.38	3.9
Triglyceride	0.11	0.03	3.7
Cerebroside	4.66	0.38	12.3
Sulfatide	0.77	0.18	4.3
ges.Phospholipide	9.70	4.31	2.2
Lecithin	2.36	1.66	1.4
Sphingomyelin	1.68	0.38	4.4
ges.Kephaline	4.17	2.01	2.1
Serin-Kephalin	1.94	0.66	2.9
Kolamin-Kephalin	4.01	0.78	5.2
Phosphoinosit	0.27	0.19	1.4

(W/G = Verhältnis weiße zu graue Substanz)

Die Ergebnisse sind in mmol/100 g Frischgewicht ausgedrückt.

Interessant erscheinen auch noch die Gesamtprozentzahlen:

weiße Substanz: 30,4 %

graue Substanz: 15,85 %

Problemstellung

Wie bereits aufgeführt, sind ausreichend chromatographische Differenzierungen der Lipidkomponenten der Myelinscheide vorhanden und sollen als Wegweiser für die histochemischen Untersuchungen dienen. Diese hat der Chromatographie gegenüber den Vorteil, daß bei der Untersuchung die Intaktheit der Myelinscheidenstruktur beurteilt werden kann, so daß Fehler infolge Demyelinisierung vermieden werden. Dagegen fehlte bei der Histochemie bisher die Möglichkeit der Konzentrationsangabe. Aufgabe dieser Arbeit ist es, eine Methode zu erstellen und auszuwerten, die es erlaubt, neben der Beurteilung der Myelinstruktur eine quantitative Auswertung der histochemischen Färbungen durchzuführen.

Material und Methodik

Verwendet wurden Nerven schlachtreifer Schweine (ca. 6 Monate alt, Geschlechtsverhältnis ca. 1:1, die männlichen Schweine waren kastriert). Zwischen der elektrischen Betäubung und der Nervenentnahme am halbierten Tier lag ein Zeitraum von 7-10 min. Präpariert wurde der nervus ischiadicus unter Anleitung durch einen Veterinärmediziner. Das so gewonnene, ca. 5 cm lange Nervenpräparat wurde im Verhältnis 4:1 geteilt und der größere Anteil sofort in Calcium-Formol nach Baker fixiert. Der zweite Teil des Präparates, der für die Resorzin-Nitrit-Methode gebraucht wurde, wurde auf Eis zum Labor transportiert.

Wegen der unterschiedlichen Fixierungs- und Färbezeiten wurde ein Arbeitsplan erstellt, der es ermöglichte, bei genauer Zeiteinteilung mehrere Färbungen gleichzeitig durchzuführen. Die Nervenpräparate wurden auf einem Gefrieremikrotom geschnitten und mit einer für die jeweilig darzustellende Fettsäure spezifischen Färbung behandelt.

Ausgehend von der Überlegung, daß bei immer gleicher Färbemethode und -technik die Intensität der Färbung proportional zur Konzentration der speziell angefärbten Fettsäure im Gewebe sein müßte, wurden die gefärbten Präparate unter einem Mikrophotomultiplier photometrisch ausgemessen.

Beschreibung des Meßvorganges

Da infolge der Netzspannungsschwankungen die Lampenhelligkeit und damit die Mikrophotometeranzeige zu stark schwanken würde, wird das Anschlußgerät über einen Spannungsstabilisator betrieben.

Das zu photometrierende Objektdetail wird in die Gesichtsfeldmitte gebracht und durch ^{eine} Meßblende $\varnothing$ 1 mm ausgeblendet.

Das Scharfstellen der Ziffern und der Meßöffnung erfolgt durch Drehen am Rändel des Fernrohres. Das Objekt wird mit dem Feintrieb scharfgestellt, so daß Öffnung und Objekt gleichzeitig scharf erscheinen.

Das Objektbild in der Ebene der Meßöffnung ist um den Faktor 0,8 verkleinert, so daß der Abbildungsmaßstab als das Produkt von

Maßstabzahl d. Objektivs $\times$ Vergrößerung d. Okulars $\times$ 0,8 erscheint
 $60:1 \quad \times \quad 12,5 \quad \times \quad 0,8 = 600\text{-fach}$
d.h. die Meßöffnung von 1 mm $\varnothing$ entspricht einem Objektfeld von 1/600 mm $\varnothing$.

Gleichzeitig wird durch Einschalten einer Spezialgesichtsfeldblende das rund um die Meßöffnung beleuchtete Gesichtsfeld so weit als möglich verkleinert, jedoch soll die Meßöffnung durch die Gesichtsfeldblenden nicht berührt werden. Zur Beleuchtung findet ein entspiegelter, achromatischer, aplanatischer Kondensor Verwendung, der bei Arbeiten mit dem Objektiv 1:60 zu immergieren ist.

Da in einem gefärbten Nervenpräparat sich abwechselnd Axonplasma und Myelinscheide in einem annähernd gleichförmigen Streifenmuster darstellen, soll die Auswertung der Absorptionsmessung optimiert werden.

An das Anzeigegerät wird ein Schreiber angeschlossen, der die Ausschläge registriert, die entstehen, wenn man das Präparat senkrecht zum Streifenmuster unter der Meßöffnung durchschiebt.

Zu prüfen bleibt die Möglichkeit, das Integral unter der Kurve für quantitative Aussagen zu verwerten.

Vom Schreiber wird nur die Transmission geschrieben, so daß die Umrechnung auf Extinction nach der Formel $T = 10^{-E}$ oder $E = \log \frac{1}{T}$ erfolgen kann.

Zur Vermeidung systematischer Fehler fand ein spezielles Mikrotom Verwendung, bei dem laut Herstellerangabe immer gleichbleibende Schnittdicken erhalten werden. Das Mikrotom befand sich in einem Arbeitsraum, der auf eine konstante Temperatur von -25°C abgekühlt wurde. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, in diesem Arbeitsraum die Nervenpräparate auf die Mikrotomteller aufzufrieren. Das Messer wurde von einem Motor angetrieben, so daß die Schnitte immer mit der gleichen Geschwindigkeit abgetragen wurden.

Die Färbelösungen wurden jeweils neu angesetzt und die einzelnen Färbeschritte mit der Stoppuhr genau kontrolliert.

Standardisierung der Meßwerte

Ein ca. 5 cm langes Nervenpräparat wurde in fünf gleiche Teile geschnitten, von jedem Stück nach entsprechender Vorbehandlung 30 Schnitte angefertigt, wovon jeweils 10 Schnitte mit der Sauren-Haematein-Methode, der PAS-Methode nach Hotchkiss und der Plasmalogenfärbung gefärbt wurden. Somit kann nachgeprüft werden, ob bereits im Verlauf eines Nerven Farbunterschiede auftreten und es ergibt sich ein Wert, der mit den Mittelwerten der Präparate verschiedener Nerven verglichen werden kann.

PAS-Färbung nach Hotchkiss

1. 25.5 ± 3.0
2. 23.4 ± 3.7
3. 27.1 ± 1.9
4. 24.5 ± 1.6
5. 26.1 ± 1.5

Saure Haematein-Methode

1. 1.2 ± 0.7
2. 1.6 ± 0.8
3. 4.1 ± 1.6
4. 3.7 ± 1.4
5. 3.8 ± 1.2

Plasmalogenfärbung

1. 60.3 ± 1.9
2. 60.6 ± 2.4
3. 59.6 ± 2.6
4. 59.9 ± 2.4
5. 60.9 ± 1.3

Plasmalogenfärbung

1. Stück		2. Stück		3. Stück	
Nr.	Transmission	Nr.	Transmission	Nr.	Transmission
1	59.6	1	61.3	1	56.9
2	62.6	2	60.8	2	57.6
3	59.0	3	58.2	3	59.9
4	60.1	4	62.7	4	61.1
5	61.3	5	65.1	5	58.9
6	60.4	6	61.7	6	56.2
7	56.7	7	61.8	7	59.2
8	61.5	8	58.2	8	63.0
9	58.4	9	58.5	9	58.9
10	63.0	10	57.6	10	64.5
$\bar{x} = 60.3$		$\bar{x} = 60.6$		$\bar{x} = 59.6$	
SAQ = 33.4		SAQ = 52.3		SAQ = 59.9	
$Sx^2 = 3.7$		$Sx^2 = 5.8$		$Sx^2 = 6.65$	
Sx = 1.9		Sx = 2.4		Sx = 2.6	

4. Stück		5. Stück	
Nr.	Transmission	Nr.	Transmission
1	60.2	1	58.8
2	56.5	2	62.4
3	58.8	3	60.2
4	64.8	4	61.2
5	57.2	5	60.7
6	59.3	6	60.6
7	60.7	7	62.8
8	59.8	8	61.5
9	62.2	9	61.8
10	59.4	10	59.0
$\bar{x} = 59.9$		$\bar{x} = 60.9$	
SAQ = 50.7		Sxx = 15.7	
$Sx^2 = 5.6$		Sx = 1.3	
Sx = 2.4			

Saure Haematein-Methode

1. Stück		2. Stück		3. Stück	
Nr.	Transmission	Nr.	Transmission	Nr.	Transmission
1	1.6	1	2.2	1	3.8
2	0.0	2	1.8	2	2.2
3	0.4	3	1.0	3	6.6
4	0.85	4	0.0	4	3.7
5	1.0	5	1.0	5	1.9
6	1.5	6	2.4	6	3.1
7	1.4	7	1.6	7	3.8
8	1.5	8	1.6	8	5.5
9	2.0	9	1.9	9	6.0
10	2.2	10	1.9	10	4.1
	$\bar{x} = 1.2$		$\bar{x} = 1.6$		$\bar{x} = 4.1$
	SAQ = 4.3		SAQ = 6.1		SAQ = 22.01
	Sxx = 0.47		Sxx = 0.67		Sxx = 2.4
	Sx = 0.7		Sx = 0.8		Sx = 1.6

4. Stück		5. Stück	
Nr.	Transmission	Nr.	Transmission
1	3.4	1	4.5
2	2.6	2	2.3
3	4.3	3	2.0
4	2.8	4	4.5
5	5.5	5	3.2
6	5.1	6	5.5
7	4.0	7	4.1
8	5.6	8	5.2
9	1.8	9	3.5
10	2.3	10	3.2
	$\bar{x} = 3.7$		$\bar{x} = 3.8$
	SAQ = 17.34		SAQ = 13.82
	Sxx = 1.9		Sxx = 1.5
	Sx = 1.4		Sx = 1.2

PAS-Färbung nach Hotchkiss

1.Stück		2.Stück		3.Stück	
Nr.	Transmission	Nr.	Transmission	Nr.	Transmission
1	22.8	1	26.1	1	31.1
2	26.8	2	25.9	2	27.4
3	27.0	3	22.3	3	26.1
4	29.0	4	19.4	4	27.8
5	26.3	5	19.0	5	26.8
6	32.1	6	27.1	6	27.2
7	24.9	7	29.9	7	25.6
8	28.9	8	20.3	8	27.8
9	22.1	9	23.2	9	27.6
10	25.3	10	20.6	10	23.8
$\bar{x} = 26.5$		$\bar{x} = 23.4$		$\bar{x} = 27.1$	
SAQ = 80.8		SAQ = 123.77		SAQ = 31.55	
Sxx = 9.0		Sxx = 13.8		Sxx = 3.5	
Sx = 3.0		Sx = 3.7		Sx = 1.9	

4.Stück		5.Stück	
Nr.	Transmission	Nr.	Transmission
1	25.7	1	25.0
2	23.3	2	24.6
3	25.9	3	29.1
4	25.6	4	25.8
5	24.8	5	26.1
6	24.0	6	24.6
7	23.5	7	27.9
8	24.1	8	24.7
9	22.3	9	25.7
10	27.5	10	27.5
$\bar{x} = 24.5$		$\bar{x} = 26.1$	
SAQ = 24.38		SAQ = 21.44	
Sxx = 2.71		Sxx = 2.38	
Sx = 1.6		Sx = 1.5	

Fixierung

ADAMS schlägt für fast alle Färbemethoden zur Darstellung von Lipiden der Myelinscheide die Fixierung mit Calcium-Formol vor. ROMEIS (1968) nimmt zu dieser Fixierung ausführlich Stellung. Außer dem niedrigen Preis und der Tatsache, daß Formol, Farbe und Struktur der Präparate gut konserviert werden, stellt er vor allem das gute Diffusionsvermögen und die geringe Neigung zur Niederschlagsbildung in den Vordergrund.

Messungen von WÜSTENFELD ergaben, daß Formol 2,6mal schneller als Alkohol, 4,49mal schneller als Zenker, 6,31mal schneller als Carnoy, 6,84mal schneller als Susa diffundiert. Dies erscheint besonders wichtig, da durch eine schnelle Diffusion der Fixierungsflüssigkeit den Autolyseprozessen, die innerhalb kürzester Zeit zu Änderungen der jeweiligen Lipidkonzentration der Myelinscheide führen, Einhalt geboten wird.

Überlegungen über die Temperatur, bei der Nervenpräparate mit Formol fixiert werden sollen, erscheinen in diesem Fall nicht eindeutig, da man bei einer niedrigen Temperatur eine Verlangsamung des Diffusionsvorganges in Kauf nehmen muß. Auf der anderen Seite erreicht man den Vorteil der Verlangsamung der Autolyse.

Aus diesen Überlegungen heraus wurden die Präparate bei Erhalt in eine normal temperierte Formollösung eingelegt, um eine möglichst schnelle Fixierung der Oberfläche durch schnelle Diffusion zu erreichen; anschließend wurde die Flüssigkeit mit dem Präparat im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt.

Formol-Calcium nach BAKER

10 ml Formol 40 %

10 ml 10%ige Calcium-Chloridlösung

80 ml dest. Wasser

zur Neutralisierung wird ein Stück Kreide hinzugegeben.

Wirkmechanismus des Formaldehydes

Formaldehyd kann an Gewebeskolloide sowohl chemisch fest gebunden, als auch durch Adsorption (Adsorptionspolymerisate) angereichert werden. Formol wird von den Geweben in Wasser zäh festgehalten, wird aber bei Änderung der physikochemischen Bedingungen z.B. in sauerem Milieu, in Alkohol und besonders in Wärme schnell freigegeben (PISCHINGER 1943).

Es vermag Fette und Lipide in erstaunlich hohen Grad zu stabilisieren, ohne sie im eigentlichen Sinn zu fixieren. Wenn die Lipide auch nicht unverändert bleiben, so werden sie doch erheblich unempfindlicher gegen typische Lösungsmittel. Bei Einwirkung über längere Zeit kommt es aber nicht nur zu einem mengenmäßigen Schwund gewisser Lipide aus dem Gewebe, sondern auch zu Veränderungen bestimmter histochemischer Eigenschaften, wie z.B. Änderungen der Löslichkeit, Färbbarkeit, Doppelbrechung (DA ROCHA-LIMA 1912, BOEMINGHAUS 1920). Die Extraktion frischer Organe mit Fettlösungsmitteln liefert immer höhere Werte als die Extraktion formolfixierter Organe (HAMMAR 1924, KUTSCHERA-AICHBERGEN 1925). Spätere Untersuchungen haben ergeben, daß es sich bei den in die Formollösung übertretenden Lipiden vorzugsweise um Phospholipide handelt, während Cholesterinverbindungen, Cerebroside (KIMMELSTIEL 1925, WEIL 1929, MLADENOVIC und LIEB 1929) und Triglyceride (WEIL 1929) in der Formollösung keine ins Gewicht fallende Abnahme erfahren. Der Verlust an Phospholipiden macht nach Versuchen am Nervengewebe etwa 30% in 15 Tagen (KIMMELSTIEL 1925, 1929) bzw. 102 Tagen (WEIL 1929) aus. Die Abnahme der Phosphatide beruht entweder auf einer Hydrolyse zu wasserlöslichen Verbindungen (MLADENOVIC und LIEB 1929) oder auf einem Übergang in wässrige kolloidale Lösungen (KIMMELSTIEL 1925). Dieser Verlust kann durch den Zusatz bestimmter Salze wie Calcium-Chlorid oder Kobaltnitrat zu der Formollösung ausgeschaltet werden. Die Wirkung dieser Salze beruht sehr wahrscheinlich darauf, daß die Ionen die Phosphatide zur Bildung von komplexen Koazervaten mit anderen Zellbestandteilen wie Proteinen, Mukopolysacchariden veranlassen, bzw. daran hindern, in Lösung zu gehen (CAIN 1947 a).

Das Calcium-Formolgemisch nach BAKER (1944) nutzt die Tatsache aus, daß Calcium auf die Grenzflächen zwischen Phosphatiden und Wasser stabilisierend wirkt. BERG (1951) hat bei einer Prüfung der lipidlösenden Wirkungen verschiedener Lösungsmittel in fixierten Schnitten keinen Unterschied zwischen dem gewöhnlich formolfixierten Material und solchem Material feststellen können, das in einem Calcium-Formolgemisch fixiert worden ist.

Diese Beobachtung bedeutet eine Bestätigung der Ansichten von BAKER über den Mechanismus, der für die Erhaltung der Phospholipide durch Calciumionen verantwortlich ist. Die Phosphatide werden zwar stabilisiert, aber nicht im eigentlichen Sinne des Wortes fixiert, sondern nur an einer Diffusion in die Fixierflüssigkeit gehindert, so daß sie auch weiterhin durch Fettlösungsmittel extrahiert werden können.

FEYRTER'sche Einschlußfärbung

Zur Unterscheidung zwischen der lipidhaltigen Markscheide und dem mehr aus Proteinen bestehenden Axonplasma wurde die FEYRTER'sche Einschlußfärbung gewählt.

Lipide, die mit bestimmten basischen Farbstoffen der Thiazin-Gruppe eine Metachromasie zeigen, wurden von FEYRTER(1942) als chromotrope Lipide bezeichnet. Sie finden sich "vorwiegend intracellulär entweder rein und dann meist diffus verteilt oder an Körnchen gekettet" (FEYRTER 1942). Die Metachromasie ist leider nur kurze Zeit haltbar und zeigt dann bereits grobe Artefakte (SCHARF 1952). Während PISCHINGER (1943) in der Einschlußfärbung lediglich eine wertvolle morphologische Methode gesehen hat, gesteht

SCHARF(1952)der roten und blauen Chromotropie indessen die Bedeutung echter histochemischer Reaktionen zu, welche allem Anschein nach verschiedene Lipidgruppen erfassen: bei Färbung mit dem Weinstein säure-Thionin-Gemisch bilden sich Myelinfiguren ab, bei Anwendung des Weinstein säure-Kresylecht-violett-Gemisch dagegen nicht.

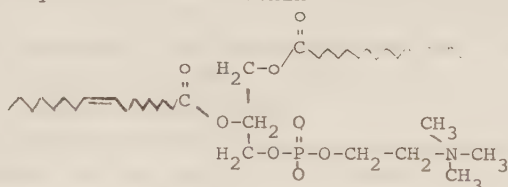
BANTE (1949) vermutet,daß die chromotropen roten Lipide und Lipoproteide höchstwahrscheinlich zur Gruppe der Ganglioside gehören. Untersuchungen von FEYRTER (1942) an reinen Fettsäuren ergaben, daß ausschließlich die Cerebroside stets eine sehr kräftige, leuchtend rote Chromotropie zeigen.

DIEZEL (1945) hat der Thioninmethode sogar eine gewisse Spezifität für die Neuraminsäure der Ganglioside zuerkennen wollen. In dieser Untersuchung soll die FEYRTER'sche Einschlußfärbung lediglich die Grundlage zu einer morphologischen Begutachtung des Präparates bieten, so daß Schäden an der Myelinscheide, die z. B. bei der Probenentnahme entstehen können, die Meßergebnisse nicht verfälschen.

Glycerinphosphatide

Grundbestandteil : L = Glycerinphosphorsäure

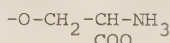
1) Phosphatidyleholin = Lecithin



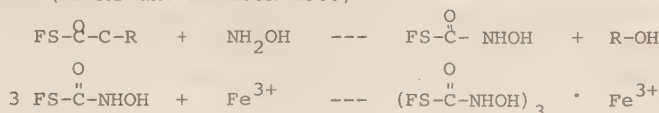
2) Phosphatidyläthanolamin = Colamin-Kephalin



3) Phosphatidylserin = Serin-Kephalin



Fettsäureesterverbindungen wurden histochemisch dadurch entdeckt, daß sie mit Eisenammoniumhydroxyd einen Farbkomplex bilden (ADAMS und DAVISON 1959)



Die Fettsäureketten der Triglyceride, Glycerinphosphatide und Cholesterinester sind durch eine reaktive Esterbindung an den Rest des Moleküls gebunden. Bei den Sphingolipiden wiederum sind die Fettsäuren mit einer nichtreaktiven Amidbindung an das Spingosin gebunden. Da die Reagentien in diesem Test in wässriger Lösung sind, können nur die hydrophilen Fette der Schnitte reagieren. D.h. die hydrophoben Triglyceride und Cholesterinester reagieren nicht, die hydrophilen Glycerinphosphatide werden jedoch mit der Eisenammoniumhydroxydfärbung bläufarbig gefärbt. Die nur schwach ausgeprägte Farbe führte dazu, daß diese Färbung nur von theoretischem Wert war, bis GALLYAS (1963) den Eisenchelatkomplex durch eine Reduktion von Silber ersetzte. Der Ammoniumhydroxylfettsäureester, der durch die alkalische Hydrolyse gebildet wird, reduziert Silbernitrat, so daß die Glycerinphosphatide schwarz gefärbt werden. Diese Methode hat nur den Nachteil, daß die Silberniederschläge dazu neigen, in Fetten zu kristallisieren und damit zu verblassen. GALLYAS' Modifikation wurde nochmals geändert, indem man am Schluß der Färbung noch eine Goldtönung hinzufügte (ADAMS, BAYLISS u. IBRAHIM 1963).

Die Färbung mit Eisen-Silber oder Goldammoniumhydroxyd geht nicht an, wenn man am Anfang alkalisch hydrolysiert, da man durch Verseifung die Esterbindungen zerstört, oder die Lipide mit Chloroform-Methanol extrahiert.

Eine Absättigung der Äthylenbindungen der Fettsäuren mit Brom verändert weder grundsätzlich die Färbung, noch beeinflusst die Hydrolyse mit HgCl_2 oder mit 1N HCL den Färbevorgang. Andere histochemische Methoden werden in der Literatur zwar beschrieben, jedoch ist ihre Spezifität fraglich oder der Reaktionsmechanismus ist noch nicht erforscht und sollen deshalb hier keine Anwendung finden.

Goldammoniumhydroxydfärbung

- 1) Fixierung der freischwimmenden Schnitte in Calcium-Formol (BAKER)
- 2) 20 min Hydrolyse in eine Mischung aus gleichen Teilen
12 % NaCH
5 % Ammoniumhydroxychlorid
- 3) in 5 verschiedenen Bäder jeweils 5 min sorgfältig waschen
- 4) danach werden die Schnitte möglichst bei hellem Licht
2 Stunden lang in eine wässrige Lösung aus
0,2 % NH_4NO_3
0,1 % AgNO_3
0,025 % NaOH eingetaucht.
- 5) Nach 10-minütigem Waschen in dest. Wasser werden die Schnitte
5 min lang in 1%ige Essigsäure gestellt, wiederum 10 min in
dest. Wasser gewaschen und dann mit 0,2%igen AuCL 10 min lang
getönt.
- 6) Kurz spülen, 5min lang in 5%igem Kaliumthiosulfat stellen und
dann 10 min in dest. Wasser waschen.
- 7) Die Schnitte auf dem Objektträger trocknen, mit Alkohol entwässern, in Xylol spülen und in Glyceringelatine eindecken.

Auswertung Goldammoniumhydroxydfärbung

Präparat Ø Transmission

1	34,24
2	37,00
3	36,50
4	36,67
5	35,93
6	35,08
7	34,00
8	36,15
9	35,00
10	35,45
11	41,20
12	29,92
13	32,46
14	40,45
15	36,10
16	32,38
17	38,93
18	37,57
19	33,50
20	31,71
21	33,66
22	34,50
23	30,55
24	38,82
25	40,83

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i = \frac{1}{25} \cdot 885.52 = 35.42$$

$$SAQ : S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 219.47$$

$$\text{Varianz: } S_x^2 = S_{xx} / (n-1) = 9.14$$

$$\text{Standardabweichung: } S_x = \sqrt{S_{xx} / (n-1)} = 3.03$$

$$\text{Ø Transmission : } 35.4 \pm 3.03$$

Kritische Wertung

Die Färbung ist nicht für eine einzelne Fettsäure spezifisch, sondern für die ganze Gruppe der Glycerinphosphatide (ADAMS). Die für die Myelinscheide wichtigste Fettsäure dieser Gruppe ist das Lecithin, für das es derzeit noch keine selektive, histochemisch spezifische Färbung gibt. Eine Beurteilung wird jedoch in Verbindung mit der Sauren-Haematein-Methode möglich, bei der Lecithin und Spingomyelin dargestellt werden. Die Färbeergebnisse sind regelmäßig und erlauben eine gute photometrische Auswertung.

Nach einer Hydrolyse in 12%iger NaOH werden die einzelnen Strukturen nicht besonders deutlich hervorgehoben. Eine Unterscheidung zwischen Axon und Myelinscheide ist jedoch möglich. Die Ergebnisse liegen bereits am 2.Tag nach Probenentnahme vor.

Sauere-Haematein-Methode nach BAKER

Die wichtigsten Methoden für den histochemischen Nachweis der Esterphosphatide leitet sich von der WEIGERT'schen Markscheidenfärbung ab. Diese Färbemethode, welche erstmalig eine zuverlässige und selektive Darstellung des Lipidgemisches in den Markscheiden der Nervenfasern ermöglicht hat, beruht auf dem Prinzip der Unlöslichmachung und Beizung gewisser Lipide durch Chromsalze, wobei Verbindungen entstehen, die mit Haematoxylin blaue bis blauschwarze, schwerlösliche Farbblacke bilden.

SMITH und MAIR (1908) haben auf Grund ihrer Analysen der WEIGERT'schen Markscheidenfärbung diese Methode so abgeändert, daß sie als ein histochemischer Nachweis für Lipide in Gefrierschnitten brauchbar ist. Die Modifikation besteht in einer Beizung der formolfixierten Gefrierschnitte in gesättigtem Kaliumbichromat, Färbung in saurem KULTSCHITZKY'schem Haematoxylin 4-6 Std. lang bei 37°C und Differenzierung in dem WEIGERT'schen Borax-Ferrizyankali-Gemisch über Nacht. DIETRICH (1910) fand eine 24-stündige Chromierung am brauchbarsten.

BAKER (1944) hat bei in-vitro-Versuchen beobachtet, daß zwar Kephalin und Sphingomyelin nicht aber Lecithin allein, sondern nur in Verbindung mit anderen, an sich negativ reagierenden Lipiden einen blauschwarzen Farbton mit der SMITH-DIETRICH-Methode annehmen. BAKER (1946) hat daraufhin die optimalen Bedingungen für die Chromierung der Phosphatide analysiert und aufgrund seiner Untersuchungen die Methode durch drei Änderungen so verbessert, daß man nicht nur gleichmäßigere Resultate erzielt, sondern auch, daß diese Methode in Verbindung mit einer Pyridinextraktion sogar als histochemischer Nachweis von Esterphosphatiden (Lecithin und Kephalin) und Sphingomyelin gelten kann (CAIN 1947, LISON 1953, PEARSE 1953, PLENART 1959).

Die Änderungen bestehen in :

- Zusatz von Calciumchlorid zum Formalin
- Verwendung einer nur schwachsauren Haemateinlösung
- der Pyridinextraktionstest

Die Substanzen, die ohne Extraktion gefärbt werden und nach Extraktion ungefärbt bleiben, sind höchstwahrscheinlich Phosphatide.

CAIN (1947) hat bei der Überprüfung der BAKER'schen saueren Haematein-Methode diese als spezifisch für Phosphatide gefunden. Es dürfte aber nur ein eindeutig positives Ergebnis berücksichtigt werden, da hellblaue und graue Farbtöne auch durch andere Lipide erzeugt werden können. Um die eben erwähnten schwach-positiven Farbeffekte auszuschließen, ist eine peinlich genaue Einhaltung der von BAKER gegebenen und von CAIN (1947) ergänzten Vorschrift (nicht zu lange chromieren und differenzieren) notwendig (LENNERT 1955).

Die BAKER'sche Haematein-Methode gibt bei in-vitro-Versuchen nur mit Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin eine positive Reaktion. Die intensivste Reaktion zeigt Sphingomyelin, dann kommt Kephalin und schließlich Lecithin. Hochgradig gereinigte Cerebroside geben ebenso wie die natürlichen und synthetischen Triglyceride negative Resultate (BAKER 1947, CASSELMANN 1952).

Pyridinextraktionstest:

- 1) Fixieren in schwachem Bonin'schem Gemisch 20 Std.lang
 - 50 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure
 - 10 ml Formalin
 - 5 ml Eisessig
 - 35 ml dest. Wasser
- 2) 1 Std.lang 70%iger Alkohol
- 3) 30 min.lang 50%iger Alkohol
- 4) 30 min.in fließendem Wasser waschen
- 5) 1 Std.lang in Pyridin bei Zimmertemperatur
- 6) Pyridin wechseln
- 7) 24 Std.lang in Pyridin bei 60°C
- 8) 2 Std.lang in fließendem Wasser auswaschen
- 9) Originalmethode

Saure Haematein-Methode modifiziert nach BAKER

- 1) Fixierung in Formol-Calcium nach Baker ca. 24 Std. lang
- 2) Gefrierschnitte werden gleich auf den Objektträger gelegt und getrocknet
- 3) Anschließend werden die Schnitte 18 Std. bei Raumtemperatur und 24 Std. bei 60°C in eine Lösung aus 5% Kaliumdichromat-1%iges wässriges Calciumchlorid gestellt
- 4) Nach gründlichem Waschen wird 58 Std. lang bei 37°C in saurem Haematein gefärbt

Vorbereitung der sauren Haemateinlösung:

1 ml 1%ige NaJO_4

50 ml 1%ige Hämatoxylinlösung

bis zum Siedepunkt erhitzen und nach dem Abkühlen

1 ml Eisessig hinzufügen

die Lösung muß täglich neu angesetzt werden

- 5) Dann wird sorgfältig gewaschen und anschließend 18 Std. lang in 0,25%igem Natriumtetraborat- 0,25%igem Kaliumferricyanid differenziert
- 6) Nach abschließendem Waschen in Glyceringelatine eindecken

Lezithin und Sphingomyelin werden blau bis schwarz gefärbt

Auswertung der sauren Haematein-Methode

Präp.Nr.	Ø Transmission
1	4.7
2	2.1
3	1.8
4	4.3
5	1.6
6	1.5
7	3.3
8	5.3
9	3.6
10	5.3
11	2.9
12	3.0
13	1.8
14	2.5
15	2.6
16	2.3
17	4.2
18	2.0
19	1.5
20	2.7

$$\text{Mittelwert } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i = 3.0$$

$$SAQ = S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 28.88$$

$$\text{Varianz} = S_x^2 = S_{xx} / n - 1 = 1.52$$

$$\text{Standardabweichung} = S_x = \sqrt{S_{xx} / n - 1} = 1.23$$

Ø gemessene Transmission : 3.0 ± 1.2

Kritische Wertung

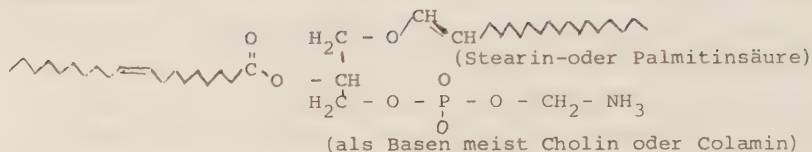
Speziell diese Methode in Verbindung mit dem Pyridinextraktionstest wird von annähernd allen Autoren als histochemisch spezifisch anerkannt. Sie ergibt gleichmäßige Färbeergebnisse, beansprucht zwar wenig Arbeit, jedoch erhält man die Ergebnisse erst nach ca. 4 Tagen.

Die Meßergebnisse der Mikrophotometrie sind auf Grund der ausgesprochen starken Farbgebung (dunkelblau bis schwarz) kaum standardisierbar, da nur eine Transmission von 3-5 erreicht wird.

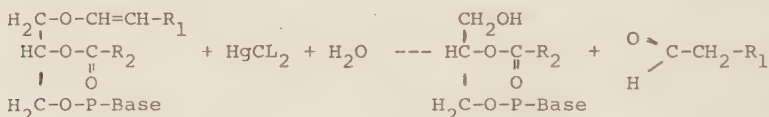
Die Strukturen der Myelinscheide werden gut dargestellt, das Axonplasma nur ganz leicht angefärbt.

Der Pyridinextraktionstest war immer negativ.

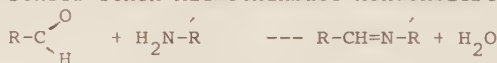
Plasmalogene



Plasmalogene sind für die Aldehydreaktion im Cytoplasma (Plasmalreaktion) verantwortlich, da sie unter bestimmten Voraussetzungen Aldehyde freisetzen. Der Stearinsäure oder Palmitinsäure entsprechende Aldehyde werden als Enoläther an CH₂OH gebunden. Das mittlere C-Atom ist immer mit einer ungesättigten Fettsäure verestert. Hydrolysiert man die ungesättigte Enolätherdoppelbindung mit HgCl₂, so wird ein Fettsäurealdehyd freigesetzt.



Das erhaltene Aldehyd wird mit dem Schiff'schen Reagenz zu einer roten Schiff'schen Azomethinbase kondensiert.



Das Gewebe wird vorher mit einem Aldehydblocker behandelt oder ein nicht hydrolysiertes Schnitt wird als Kontrolle benutzt, um die vorher vorhandene Menge Aldehyd zu bestimmen. In lebenden Geweben kann nämlich freies Aldehyd vorhanden sein oder durch Oxydation der Äthylenbindungen an der Luft gebildet werden (Pseudoplasmalreaktion). HgCl₂ reagiert nicht im Sinne einer Pseudoplasmalreaktion mit diesen Äthylenbindungen. Neuere Forschungen von NORTON und Ass. fordern, daß HgCl₂ an die 1.β-ungesättigten Ätherbindungen des Plasmalogens nach einer Hydrolyse mit HgCl₂ gebunden wird (NORTON 1959, NORTON und KOREY 1962). Die Bindung von HgCl₂ wird mit Diphenylcarbazon sichtbar gemacht. Nach Extraktion der Lipide am Anfang geht die Reaktion nicht an. Jodieren oder Bromieren verhindern auch eine anschließende Reaktion, indem sie offensichtlich an die ungesättigten Bindungen addiert werden. Oxydation mit Perameisensäure macht die Bindung unreaktiv.

NORTON folgerte daraus, daß die ungesättigte Ätherbindung $\text{CH}_2\text{-O-CH=CH}$ eine hohe Affinität zu HgCl_2 hat, während andere ungesättigte Bindungen -CH=CH- nicht reagieren. Eine Nachbehandlung mit Cyanid oder Jodid entfernt den HgCl -Komplex und verhindert somit die Farbreaktion mit Diphenylcarbazon. Im alkalischen pH-Bereich dissoziiert der Plasmalogen- HgCl_2 -Komplex und kann somit nicht gefärbt werden.

Die Möglichkeit Plasmalogene zu fixieren wird in der Literatur sehr unterschiedlich diskutiert. CAIN (1949) berichtet, daß Plasmalogene durch Säuren und Formalin schnell zerstört werden. Ebenso fanden NORTON und Ass., daß Formol und Acreolin die 1,β-ungesättigten Äthylenbindungen der Plasmalogene zerstören, jedoch schien ihnen, daß eine nur kurze Fixierung keinen Schaden hinterläßt. Der Effekt der Aldehyde ist wahrscheinlich auf die Enolätherbindung zurückzuführen, da kein Verlust von Lipidphosphor oder anderer Lipidkomponenten nach einer kurzen Fixierung der Plasmalogene festgestellt werden konnte.

GERARD (1935) hat als erster angegeben, daß die Plasmalreaktion auch an Gefrierschnitten von formolfixiertem Material ausgeführt werden könne. Die Befürchtung, das in dem Gewebe enthaltene Formol könne selbst mit der fuchsinschwefligen Säure reagieren, sei unbegründet, da gründliches Auswaschen der Schnitte zur völligen Entfernung des Formols genüge. Interessant erscheint noch die Folgerung von ALBERT und LEBLOND (1946). Sie fanden, daß eine Fixierung in neutralem Formol bis zu 48 Std. die Intensität und Verteilung der Schiff'schen Reaktion nicht verändert. Sie machten jedoch auf die Tatsache aufmerksam, daß die Färbung nach einer Formolfixierung durch einen zusätzlichen Schritt zur Oxydation der Präparate ergänzt werden muß. Schnitte, die nach der Fixierung sofort mit Sublimat und fuchsinschwefliger Säure behandelt werden, zeigen nämlich keine Schiff'sche Reaktion, wogegen Schnitte, die über Nacht in einer offenen Schale mit Wasser liegenblieben, eine intensive und gleichmäßige Reaktion zeigen.

ROMEIS (1948) lehnt die Fixierung der Plasmalogene ab, während ROULET (1948) die Formolfixierung als besonders vorteilhaft bezeichnet, man müsse nur dafür sorgen, daß das Formol vollständig ausgewaschen werde.

Mit ein Grund für die unterschiedlichen Angaben dürften die verschiedenen Formollösungen sein, da durch gepuffertes Formol ein anderes pH im Gewebe erreicht wird, als durch Zugabe von Calcium-Chlorid, Calcium-Carbonat oder Sublimat. Nicht gepufferte Formollösungen (10%iges Formol des Handels mit pH 3.7) reagieren sauer und zerstören bei längerer Einwirkung Acetale (HAYES 1947).

Plasmalogenfärbung modifiziert nach Hayes 1949

- 1) Gewebe 3 Std. in Calcium-Formol fixieren
- 2) Gefrierschnitte gleich auf den Objektträger legen
- 3) 10 min. lang in 2%ige Sublimatlösung eintauchen
- 4) in 3 aqua dest.- Bädern waschen
- 5) 20 min. mit dem Schiff'schen Reagenz färben
wegen der Verunreinigung mit Sublimat sollte das
Reagenz nicht wiederbenutzt werden
- 6) 3 Spülgänge in angesäuertem Bisulfitwasser
(10% $K_2S_2O_5$ in 0.05 N HCL)
- 7) 20 min. mit dest.Wasser aus einer Spritzflasche abspülen
- 8) Mit Glyceringelatine eindecken

Plasmalogene werden rosa bis rot gefärbt

Auswertung der Plasmalogenfärbung

Präp.Nr. Ø Transmission

1	58.1
2	58.9
3	56.9
4	59.6
5	52.4
6	58.5
7	57.6
8	56.4
9	50.3
10	63.3
11	66.7
12	60.5
13	66.3
14	63.2
15	63.2
16	65.8
17	51.7
18	58.1
19	65.3
20	56.9
21	59.3
22	63.9
23	57.8
24	63.0
25	62.9

$$\text{Mittelwert : } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i = \frac{1495.8}{25} = 59.8$$

$$\text{SAQ} = S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 473.4$$

$$\text{Varianz} = S_x^2 = S_{xx} / n-1 = 19.7$$

$$\text{Standardabweichung} = S_x = \sqrt{S_{xx} / n-1} = 4.44$$

Ø gemessene Transmission 59.8 ± 4.4

Kritische Wertung

Wenn man davon ausgeht, daß das Formalin bei der Fixierung sowohl in die Myelinscheide als auch in das Axonplasma diffundiert, so müßte bei einer Beteiligung des Formalins an der Farbgebung auch das Axonplasma gefärbt sein. Beachtet man die Ergebnisse, so sieht man in manchen Fällen eine ganz leichte Anfärbung des Axonplasmas, die jedoch im Verhältnis zur Farbinintensität des Myelins vernachlässigt werden kann. Daraus kann man schließen, daß durch reichliches Waschen das Formalin genügend ausgewaschen wird.

Die Methode eignet sich gut zur Eingliederung in ein System, da sie schnelle Ergebnisse bringt (ca. 5 Std. nach Probenentnahme). Außerdem erreicht man eine deutliche Darstellung der Myelinstrukturen. Bei der photometrischen Untersuchung erhält man ganz klare Unterschiede zwischen Axon und Myelinscheide.

Adams bescheinigt dieser Färbung eine hohe Spezifität, wenn Pseudoplasmalreaktionen ausgeschlossen werden können. Da pseudoplasmatische Aldehyde durch Oxydation der Fettsäureäthylenbindungen an der Luft auftreten, wurde ganz frisches Gewebe verwendet (Schweinenerven 10 min. p.m. sofort fixiert und nach 3 Std. gefärbt), so daß Pseudoplasmale möglichst vermieden wurden.

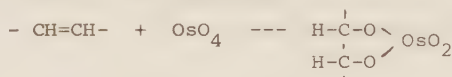
Außerdem kann die Beobachtung bestätigt werden, daß durch die kurzzeitige Fixierung eine gleichmäßigere Anfärbung der Präparate erzielt wird.

Osmiumtetroxyd- - Naphthylamin-Methode = OTAN

Die OTAN-Methode dient als zweckmäßigster Test, um zwischen hydrophilen Phospholipiden und hydrophoben Triglyceriden, Cholesterinestern und Fettsäuren zu unterscheiden. Durch Einführung einer alkalischen Hydrolyse wurde die Möglichkeit einer selektiven Demonstration von alkalistabilen Sphingolipiden, insbesondere Sphingomyelin geschaffen (ADAMS 1958).

OsO_4 ist ein zuverlässiger Indikator für das Vorhandensein von ungesättigten (Äthylen-, Doppel-, Olefin-) Bindungen in Fettsäuren, wobei OsO_4 stöchiometrisch mit den Äthylenbindungen der Fette reagiert.

Bei dieser Reaktion wird die 6-wertige Form des Osmiums zum schwarzen Osmiumdioxid reduziert.



Bei der OTAN-Methode wird durch Verwendung von Osmiumtetroxyd-Kaliumchlorat das Osmium nicht reduziert, sondern in seiner 6-wertigen, farblosen Form vorübergehend an die Äthylenbindung gebunden und durch den rot-orangen α -Naphthylamin-Chelatkomplex sichtbar gemacht (ADAMS 1959).

Die Doppelbindung in der 5.6 Position des Cholesterins reagiert nicht mit OsO_4 (ADAMS 1959, KHAN, RIEMERSMA und BOOJI 1961). Mit dem zusätzlichen Schritt der alkalischen Hydrolyse bei der NaOH-OTAN-Methode werden die Esterbindungen der Phosphoglyceride verseift, wobei die Phosphosphingoside ungerührt bleiben, da bei diesen die Fettsäurekette durch eine alkalistabile Amidbindung an das Sphingosin gebunden ist (BRANTE 1949). Daraus geht hervor, daß auch Glukosphingoside wie Cerebroside und proteingebundene Ganglioside zur Farbgebung der NaOH-OTAN-Methode beitragen können. Ebenso könnten auch noch das Phosphoglycerid Kephalin B und das Acetal des Phosphoglycerides, die jeweils eine alkaliresistente Fettsäurekette haben, reagieren.

OTAN - Methode

- 1) Fixierung in Calcium-Formol, Gefrierschnitte 10-15 μ m
- 2) Die freischwimmenden Schnitte werden 18 Std. lang in einer Mischung aus einem Teil 1%iges OsO_4

dreie Teile 1%iges KClO_3 behandelt.

Achtung: Das Gefäß, in welches die Schnitte gebracht werden, sollte mit der Flüssigkeit vollgefüllt und dicht verschlossen werden, um eine Verflüchtigung des OsO_4 zu verhindern.

- 3) Die Schnitte 10 min. lang in dest. Wasser waschen und auf den Objektträger legen.
- 4) Anschließend werden die Schnitte in einem Inkubator bei 37° C mit einer wässrigen Lösung von β -Naphthylamin 15 min. lang behandelt.

Die gesättigte, wässrige Lösung wird wie folgt hergestellt:
ausreichend β -Naphthylamin in dest. Wasser auf 40°C erhitzen und dann filtrieren.

Vorsicht! α -Naphthylamin kann mit dem Karzinogen β -Naphthylamin verunreinigt sein

- 5) Schnitte 5 min. lang in dest. Wasser waschen
- 6) Gegenfärbung in 2%igem Alcian blue in 5%iger Essigsäure 15-20 sec.
- 7) Mit Glyceringelatine eindecken

Die Phospholipide werden orangerot gefärbt .

Auswertung der OTAN - Methode

Präparat	Ø Transmission	Präparat	Ø Transmission
1	10.86	21	12.89
2	10.50	22	12.83
3	13.33	23	11.92
4	11.63	24	12.00
5	9.69	25	13.11
6	11.64	26	9.86
7	10.82	27	12.06
8	11.78	28	12.29
9	12.38	29	12.46
10	9.82	30	11.66
11	12.38	31	13.00
12	9.95	32	11.67
13	11.66	33	9.63
14	13.50	34	12.75
15	13.06	35	9.71
16	10.30	36	13.36
17	11.50	37	12.33
18	10.25	38	11.36
19	13.38	39	13.53
20	10.90	40	9.78

$$\text{Mittelwert : } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i = 467.53 / 40 = 11.7$$

$$\text{SAQ : } S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 61.16$$

$$\text{Varianz : } S_x^2 = S_{xx} / n - 1 = 1.57$$

$$\text{Standardabweichung : } S_x = \sqrt{S_{xx} / (n - 1)} = 1.253$$

$$\text{Ø gemessene Transmission : } 11.7 \pm 1.3$$

Kritische Wertung

Mit der Osmiumtetroxyd-1-Naphtylamin-Methode erzielt man eine ausgezeichnete Darstellung der jeweiligen Myelinstrukturen, was eine Auswertung erheblich erleichtert. Die Ergebnisse liegen nach drei Tagen vor, so daß die Möglichkeit zur Eingliederung in eine Systemuntersuchung besteht. ADAMS beurteilt die Reaktion als spezifisch.

In Verbindung mit einer alkalischen Hydrolyse erreicht man eine selektive Darstellung von Sphingomyelin.

NaOH - OTAN - Methode

- 1 a) Fixierung in Calcium-Formol, Gefrierschnitte 10-15 n
- 1 b) Die freischwimmenden Schnitte werden mit 2N NaOH bei 37°C 1 Std. lang hydrolysiert
- 1 c) Die Schnitte werden sorgfältig in Wasser gewaschen, in 1%iger Essigsäure gespült und anschließend wieder in Wasser gewaschen.
- 2) Normal-OTAN-Methode

Auswertung NaOH - OTAN - Methode

Präparat	Ø Transmission
1	15.11
2	15.07
3	15.41
4	16.11
5	15.70
6	15.92
7	15.56
8	17.14
9	15.56
10	17.73
11	17.69
12	15.23
13	16.70
14	17.82
15	15.00
16	14.75
17	15.31
18	16.08
19	15.93
20	15.06
21	16.16

$$\text{Mittelwert : } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i = 335.04 / 21 = 15.95$$

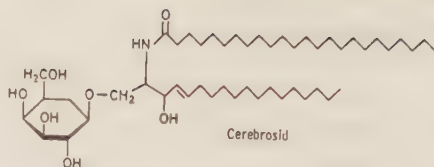
$$\text{SAQ : } S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 20.10$$

$$\text{Varianz : } S_x^2 = S_{xx} / n-1 = 1.005$$

$$\text{Standardabweichung : } S_x = \sqrt{S_{xx} / n-1} = 1.01$$

$$\text{Ø gemessene Transmission : } 15.95 \pm 1.01$$

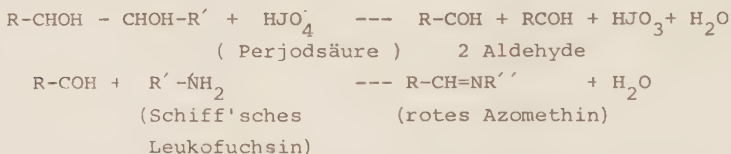
Cerebroside



Cerebroside und Sulfatide sind Monosaccharide mit Galaktose in glykosidischer Bindung. Als Fettsäure ist meist eine C_{24} -Säure zu finden.

Es gibt derzeit keinen absolut spezifischen Test zur histochemischen Unterscheidung zwischen Cerebrosiden und protein-gebundenen Gangliosiden. Die PAS-Methode färbt die Glykol-Gruppe der beiden Substanzen.

Reaktionsablauf :



Im Gewebe frei vorhandene Ganglioside werden wegen ihrer Wasserlöslichkeit nicht gefärbt. Da die Polysaccharide ebenso gut wie die Glykolipide gefärbt werden können, kann das Vorhandensein von Glykolipiden durch eine Extraktion mit Lipid-solventien bestätigt werden (ADAMS und BAYLISS 1963). Außerdem fanden ADAMS, BAYLISS und IBRAHIM (1963), daß auch Äthylenebindungen mit der Standard-PAS-Methode reagieren. Wegen der hohen Reaktivität dieser Bindungen und der theoretischen Möglichkeit einer Reaktion mit Amino-2 Hydroxyl- oder Amino-2 Ammoniumhydroxylgruppen führten sie eine aufeinanderfolgende Blockade dieser Gruppen mit Chloramin T, Perameisensäure und 2.4 Diphenylhydrazin ein. Die Aldehyde oder Ketone, die aus den Äthylenebindungen durch die Perameisensäure und durch oxydative Desaminierung mit Chloramin T entstehen, ebenso wie bereits vorhandene Ketone, Plasmalogene und pseudoplasmatische Aldehyde werden durch 2.4 Dinitrophenylhydrazin geblockt.

Erst wenn diese Schritte eingeschaltet sind, wird dieser Färbung von ADAMS die Spezifität zuerkannt. Bei der Bearbeitung einiger Präparate von peripheren Nerven mußten wir feststellen, daß nach der Behandlung mit Chloramin T, Perameisensäure und 2.4 Dinitrophenylhydrazin das Präparat fast vollständig aufgelöst wurde.

Dies dürfte mit der Auflösung des Neurokeratinskelettes zusammenhängen. Ähnliche Beobachtungen werden von FEIGIN und CRAVIOTO (1961) beschrieben. Sie berichten, daß Glukolipide im peripheren Nerv, die mit der PAS-Färbung gefärbt wurden, nicht mit Lipidsolventien extrahiert werden konnten. Sie schlossen daraus, daß Cerebroside im peripheren Nerv an das Neurokeratin gebunden ist.

Aufgrund dieser Beobachtungen und wegen des bekannten Reaktionsablaufes der PAS-Färbung wurden weitere PAS-Methoden ausprobiert, wobei die besten Ergebnisse mit der PAS-Methode nach HOTCHKISS erzielt wurden. Über eine histochemische Spezifität dieser Methode konnte in der Literatur keine Aussage gefunden werden. Die ausschließliche Farbgebung der Myelinscheide, die ausgesprochen gleichmäßig und auch intensiver als die Standard-PAS-Färbung ist, läßt auf eine Spezifität für in der Myelinscheide vorhandene Fettsäuren schließen. Zieht man zusätzlich in Betracht, daß bei dieser Methode die Präparate mit Lipidsolventien behandelt werden, so dürfte dies ein weiterer Hinweis auf die an Neurokeratin gebundenen Cerebroside sein.

PAS - Methode nach Hotchkiss

- 1) Gefrierschnitte auf den Objektträger legen und antrocknen lassen
- 2) 15 min. in 70%igem Äthanol stellen
- 3) 30 min. in Hotchkiss-Perjodsäurelösung

Herstellung :

Perjodsäure ($\text{HJO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,6 g
M/5 Na-Acetat (2,72 g/100 ml)	7,5 ml
Äthanol	52,5 ml
Aqua dest	15 ml

die Lösung ist nur wenige Tage haltbar!

- 4) kurz in Äthanol spülen
- 5) 15 min. in Hotchkiss-reduzierende-Lösung

Herstellung :

Kaliumjodid	2 g
Na-Thiosulfat	2 g
Äthanol	60 ml
Aqua dest	40 ml
2n HCL	1ml

bei kühler Lagerung längere Zeit haltbar!

- 6) kurz in Äthanol spülen
- 7) 2 Std. in Schiff'schem Reagenz färben
- 8) 20 min. in fließendem Wasser spülen
- 9) in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässern und mit Entelan eindecken.

Die Myelinscheide wird dunkelrot gefärbt.

Auswertung der PAS - Methode

Präp.Nr.	Ø gemessene Transmission
1	27.9
2	36.8
3	27.8
4	30.1
5	33.9
6	37.5
7	30.2
8	27.6
9	26.9
10	31.6
11	26.7
12	32.3
13	36.3
14	25.8
15	32.4
16	28.7
17	24.6
18	35.1
19	31.7
20	25.5

$$\text{Mittelwert : } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i = \frac{609.4}{20} = 30.5$$

$$\text{SAQ : } S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 300.6$$

$$\text{Varianz : } S_x^2 = S_{xx} / n-1 = \frac{300.6}{19} = 15.8$$

$$\text{Standardabweichung : } S_x = \sqrt{S_{xx} / n-1} = 4.0$$

$$\text{Ø gemessene Transmission } 30.5 \pm 4.0$$

Kritische Wertung

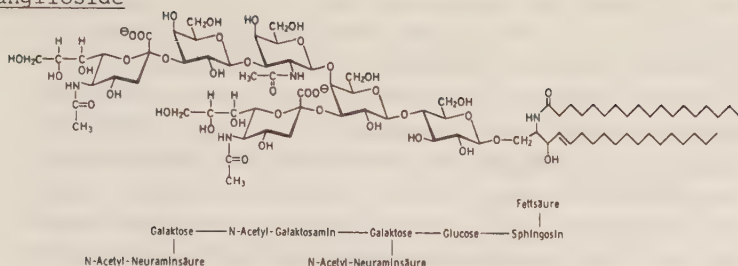
Die von ADAMS et al. als spezifisch dargestellte Färbemethode, die er an Hirnschnitten anwandte, ließ sich bei Nervenpräparaten nicht durchführen. Auch bei dickeren Schnitten löste sich das Präparat bei Einbringen in die Perameisensäure annähernd vollständig auf. Dies erscheint auch verständlich, wenn man bedenkt, daß durch alkalische Hydrolyse und Desaminierung (= Herauslösen des Neurokeratinskelettes) der überwiegende Teil des Gewebes entfernt wird.

Führt man nur die Standard-PAS-Färbung durch, so erhält man nur eine makroskopisch sichtbare Anfärbung, die bei Vergrößerung kaum noch erkennbar ist. Deshalb wurden andere PAS-Methoden durchgeführt, von denen die PAS-Methode nach HOTCHKISS die besten Ergebnisse lieferte.

In der Literatur wird die Spezifität dieser Methode nicht diskutiert.

Da jedoch ausschließlich die Myelinscheide dargestellt wird, muß auch dieser Methode eine gewisse Spezifität zugestanden werden. Die gute Farbgebung der Myelinstrukturen ermöglicht eine leichte photometrische Auswertung. Da die Ergebnisse bereits am zweiten oder dritten Tag nach Probenentnahme vorliegen, läßt sich auch diese Färbung leicht in ein System eingliedern.

Ganglioside



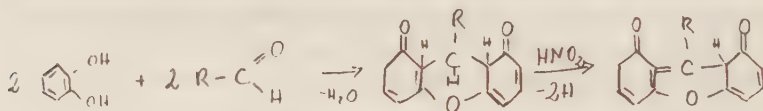
Ganglioside sind cerebrosideartige Substanzen, die hauptsächlich in der grauen Substanz, in geringer Menge auch in der weißen Substanz des ZNS vorkommen (BRANTE 1951, 1952), sind aber auch aus der Rindermilz isoliert worden (KLENK und RENNKAMP 1942).

Die erstmals von KLENK (1939) isolierten Ganglioside sind in ihrer Konstitution noch nicht völlig aufgeklärt. Als Bausteine enthalten sie jedenfalls Sphingosin oder eine sphingosinähnliche Base, Fettsäuren, Hexosen (Galaktose bzw. Glukose) sowie die für Ganglioside charakteristische Neuraminsäure. Letztere ist ein Kondensationsprodukt von Mannosamin mit Brenztraubensäure. Sie kommt am häufigsten in acetylierter Form vor (KLENK und DEBUCH 1959).

KLENK hat außerdem aus einem Gangliosidegemisch zwei Vertreter, ein hexosaminfreies und ein hexosaminhaltiges Gangliosid, abtrennen können. Ganglioside sind infolge ihres hohen Gehaltes an Kohlenhydrate wasserlöslich.

DIEZEL (1957) hat die biochemische Methode von KLENK und LANGERBEIN (1941) zum Nachweis der Neuraminsäure in eine histochemische Darstellung der Neuraminsäure in Ganglioside umgewandelt, indem er BIAL's Reagenz (Orcin- FeCl_3 -HCL) benutzte. ADAMS und BAYLISS (1959) erhielten mit Orcein keine positiven Färbeergebnisse des Gehirns. Ebenso berichten SHEAR und PEARSE (1963), daß sie mit der reinen DIEZEL-Methode keine Farbgebung erreichten. Sie beschreiben eine Verbesserung des SVENNERHOLM-Neuraminsäurenachweis mit Resorcin zur histochemischen Demonstration von Neuraminsäure in Gangliosiden.

Um eine Diffusion der Ganglioside in die Fixierflüssigkeit zu vermeiden, wird unfixiertes Gewebe auf dem Cryo-Cut geschnitten und mit Formoldämpfen in einem Exsiccator fixiert. Anschließend werden die Schnitte mit Resorcin-Salzsäure behandelt. Als Grund für die saure Hydrolyse wird angegeben, daß dadurch ein reaktionsfähiges Aldehyd für die Reaktion mit Resorcin bereitgestellt wird. Die Methylenbrücke, die bei der Kondensation von zwei Molekülen Resorcin und einem Molekül des Aldehydes gebildet wird, oxydiert anschließend mit Salpetersäure und bildet ein rotes Reaktionsprodukt.



In-vitro reagieren Ganglioside, Neuraminsäure, Fruktose und Ribose, jedoch nicht RNA. Selbst Formol reagiert mit dieser Färbemethode und sollte deshalb aus dem Gewebe ausgewaschen werden (SHEAR und PEARSE 1964). Wenn das Formol genügend ausgewaschen ist, reagiert der Schnitt zwar nicht mehr mit dem Schiff'schen Reagenz, jedoch mit Resorcin-Salpetersäure. ZUGIBE et al. (1964) führen die Resorcin-HNO₃-Reaktion auf nach der Fixierung im Gewebe gebundenes Formol zurück, weil nach Behandlung der Schnitte mit Neuraminidase oder hydrolytischen Mitteln, die Färbung trotzdem anginge.

Resorcin - Nitrit - Methode

- 1) Nichtfixiertes Gewebe wird auf dem Cryo-Cut geschnitten und auf den Objektträger gelegt.
- 2) Die Schnitte werden in Dämpfen von konzentriertem, handelsüblichem Formol in einem Exsiccator mindestens 72 Std. lang fixiert.
- 3) Die Schnitte werden anschließend 1 Std. lang in fließendem Wasser gewaschen und dann getrocknet.
- 4) Einige Tropfen eines Reagenzes werden auf die Schnitte getropft, 2 min. einwirken lassen. Das Reagenz wird wie folgt hergestellt

5 ml 5%iges Resorcin
0.15 ml 0,1 M CuSO_4
40 ml konz. HCl

Die Lösung wird umgerührt und muß bis zur Gebrauchsfähigkeit noch 2 Std. lang reifen.

- 5) Überflüssiges Reagenz wird vom Objektträger abgeschüttelt und einige Tropfen 1%iger NaNO_2 in konz. HCl für 1 min. auf die Schnitte getropft.
- 6) Die NaNO_2 -Lösung wird mit Löschpapier abgetupft. Anschließend werden die Schnitte sorgfältig an der Luft getrocknet, in Xylol gespült und eingedeckt.

Material, welches Neuraminsäure (Ganglioside) oder Acylderivate (Sialsäure) enthält, wird rot gefärbt.

Kritische Wertung

Die Spezifität dieser Färbung wird in der Literatur sehr vorsichtig beurteilt. Da durch die Bearbeitung mit konzentrierten Säuren das nur ca. 10μ dicke Nervenpräparat extrem schrumpft und verhärtet, so daß Überlappungen nicht rückgängig gemacht werden können, ist das Präparat photometrisch nicht auswertbar. Außerdem löst sich das Präparat vom Objektträger und kann erst gegen Ende der Färbung wieder an den Objektträger angetrocknet werden. Die starke Säure, die mit NaNO_2 versetzt wird, hinterläßt auf dem Präparat sehr viele ausgefallene Kristalle, die vor dem Eindecken herausgespült werden müssen.

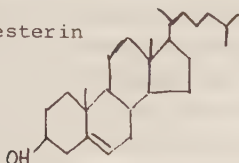
Die Präparate werden in einem Purpurrot gefärbt. Strukturen sind jedoch kaum noch zu erkennen.

Nach einer Fixierzeit von drei Tagen ist die Färbung recht einfach und innerhalb kurzer Zeit (ca. $1/2$ Std.) durchzuführen.

Diese Färbung kann nur als Nachweis der Ganglioside dienen, deren geringe Konzentration im Gewebe auch keine ausschlaggebende Rolle spielt.

Cholesterin - Cholesterinester

1) Cholesterin



Cholesterin kann wegen 3.β-Hydroxylgruppe als sekundärer einwertiger Alkohol bezeichnet werden. Es trägt eine Doppelbindung im B-Ring und an C 17 eine lange Seitenkette. Cholesterin hat 8 Asymmetriezentren.

Wegen der scheibenförmigen Gestalt des Moleküls scheint es besonders dazu geeignet, zusammen mit den Phospholipiden am Aufbau von Membranstrukturen beteiligt zu sein.

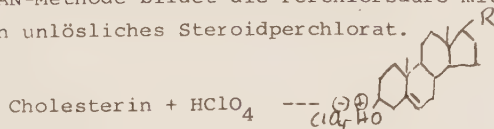
Cholesterin ist unlöslich in Wasser, Alkalien und Säuren, leicht löslich in Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Pyridin und Äther, schwer löslich in Petroläther, Aceton, Alkohol und Eisessig. Wegen seiner Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und in Lipiden kann Cholesterin nur in Gefrierschnitten von frischem oder geeignet fixiertem Material histochemisch nachgewiesen werden (CLARA 1965).

2) Cholesterinester

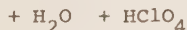
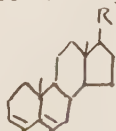
Sie entstehen durch Veresterung der 3.β-Hydroxylgruppe mit einer höheren Fettsäurekette (Palmitin-, Stearin- oder Ölsäure). Sie sind im Gewebe weit verbreitet und sehr häufig. Cholesterinester sind wie Cholesterin in Lipiden und Lipidsolventien löslich.

Prechlorsäure-Napththochinon-Methode = PAN

Bei der PAN-Methode bildet die Perchlorsäure mit dem Cholesterin ein unlösliches Steroidperchlorat.



Anschließend wird ein Molekül H₂O aus dem Salz eliminiert und so ein Cholestan- 3.5- Dion gebildet.



Cholestan- 3.5- Dion reagiert dann mit 1.2-Napthochinon-4-Schwefelsäure und bildet ein dunkelblaues Pigment. Die chemische Natur dieses Pigmentes ist nicht bekannt. Sicher ist jedoch, daß die Dionstruktur für die Pigmentbildung wesentlich ist, da sich kein Pigment bildet, wenn man zwischen den Schritten, Perchlorsäure und Napthochinon, die Doppelbindungen bromiert (LANGE, FOLZENLOGEN und KOLP 1949). Verschiedene Tests zeigten, daß nur Steroide mit der 3-hydroxy Δ^5 oder 3-hydroxy $\Delta^{5.7}$ Konfiguration eine blaue Reaktion mit der PAN-Methode geben. Lanosterol (3-hydroxy Δ^8), Cholestan, Cholestanol (3-hydroxy), Cholestenon (3-oxy Δ^4) und eine Zahl anderer Steroide geben keine blaue Farbe. Bei manchen Lanosterolen, Tryptophanen und verschiedenen Sacchariden wurde eine rosa bis rote Farbe beobachtet (ADAMS 1961).

Freies Cholesterin kann von seinen freien Säureestern durch die Unlöslichkeit in Lipidsolventien nach Bildung eines Digitonides unterschieden werden (FEIGEN 1956). Cholesterin-ester bilden keine solche unlösliche Digitonide, so daß man ihre Anfärbung dadurch umgehen kann, indem man sie vorher mit Aceton oder anderen Lipidsolventien herauslöst.

Perchlorsäure-Naphthochinon-Methode - PAN

- 1) Die Gefrierschnitte sollen mindestens eine Woche lang in Formol frei schwimmen, um eine ausreichende Oxydation des Cholesterins zu erreichen.
- 2) Schnitte auf den Objektträger aufziehen und antrocknen lassen.
- 3) Die Schnitte werden mit einem Reagenz bestrichen und auf einer Ofenplatte bei $60-70^{\circ}\text{C}$ ca. 5-10 min. lang erhitzt, bis die zuerst erscheinende rote Farbe in ein dunkles Blau umschlägt. Man muß dabei darauf achten, daß das Gewebe nicht überhitzt wird, da es sonst denaturiert oder verkohlt.

Reagenz : 0,1%ige 1.2 Naphthochinon-4-Schwefelsäure
in einer Mischung aus
10 ml Perchlorsäure 60%
20 ml Äthanol
1 ml Formol 40%
9 ml Wasser

- 4) Ein Tropfen 60%iger Perchlorsäure wird auf den Schnitt getropft und dann ein Deckglas aufgelegt.

Die dunkelblaue Farbe des Cholesterins ist in Perchlorsäure einige Stunden lang stabil und schlägt dann in grau-schwarz um. Die anfänglich blaue Farbe löst sich in Wasser und Glyceringelatine auf.

Auswertung der PAN - Methode

Präp.Nr.	Ø gemessene Transmission
1	23.9
2	33.8
3	33.1
4	32.8
5	30.9
6	17.7
7	19.8
8	22.5
9	23.5
10	24.7
11	23.5
12	18.5

$$\text{Mittelwert : } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i = \frac{314.7}{12} = 26.2$$

$$\text{SAQ : } S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 351.33$$

$$\text{Varianz : } S_x^2 = S_{xx} / n-1 = 31.9$$

$$\text{Standardabweichung : } S_x = \sqrt{S_{xx} / n-1} = 5.7$$

$$\text{Ø gemessene Transmission : } 26.2 \pm 5.7$$

Kritische Wertung

Diese Methode erscheint in der Ausführung und in den Ergebnissen kaum standardisierbar. Nach anfänglichen Versuchen, bei konstanter Temperatur im Bruttofen nach Stoppuhr zu färben, wurde dazu übergangen, auf einer Heizplatte unter Sicht den Farbumschwung, der vom Rande her einsetzt, abzuwarten, um dann mit Perchlorsäure die Reaktion abubrechen. Dabei muß man schnell reagieren, da die Grenze vom Farbumschwung zum Verkohlen des Präparates sehr rasch überschritten ist, und die Heizplatte eine Temperatur von 60°C haben muß. Wahrscheinlich wird beim Abbrechen der Reaktion und gleichzeitigem Spülen mit Perchlorsäure das Ergebnis verändert, da dies nach Gefühl des Untersuchers und nach unterschiedlicher Reaktionszeit geschieht. Dies ließe sich zwar dadurch umgehen, daß man von einer Probe mehrere Präparate anfertigt und den Mittelwert errechnet. Jedoch ist dieser Arbeitsaufwand zu überlegen, da diese Methode der Chromatographie unterlegen ist, und man das Ergebnis erst nach Oxydation des Cholesterins, also erst nach einer Woche erhält. Eine Tatschache erschwert die Einordnung in ein System zusätzlich.

Eine deutliche Darstellung der Myelinscheide wird nicht erreicht. Außerdem ist eine Konservierung des Präparates nicht möglich, da bereits nach einer Stunde die blaue Farbe ins Schwarze umschlägt, und eine Auswertung dann nicht mehr möglich ist.

Nach Aussage von ADAMS ist diese Färbung sehr spezifisch für Cholesterin und seine Esterverbindungen. Wegen der schlechten Standardisierbarkeit soll sie jedoch nur eine Ergänzung des Systems sein. Andere Cholesterinfärbungen z.B. nach WEBER, PHILIPPS und BELL (1956) haben eine zu geringe Empfindlichkeit und finden daher in der Histochemie keine Verwendung.

Diskussion

Bis auf die PAS-Methode nach HOTCHKISS sind alle verwendeten Färbungen spezifisch (ADAMS und DAVISON 1959). Die auffallend selektive Anfärbung der Myelinscheide bei der PAS-Methode nach HOTCHKISS läßt auch diese Färbung spezifisch erscheinen. Die meisten Färbungen sind leicht durchzuführen und bringen schnell Ergebnisse. Außer der PAN-Methode für Cholesterin gehen alle Färbungen regelmäßig an und ergeben gleichmäßige Resultate. Bei der PAN-Methode mußten pro Schwein mehrere Schnitte angefärbt werden, da von ca. fünf Schnitten nur bei einem der Farbumschlag so getroffen wurde, daß eine Blaufärbung gemessen werden konnte. Die restlichen Präparate waren verkohlt. Außerdem können die Präparate nicht länger als 1 Stunde konserviert werden. Leider gibt es derzeit keine histochemisch spezifische Methode, mit der zwischen Cholesterin, Cholesterinester und Triglyceriden unterschieden werden kann. Dies erscheint jedoch besonders wichtig, da das vermehrte Auftreten von Cholesterinestern im Myelin ein Frühzeichen pathologischer Veränderungen darstellt. Für die wesentlichen Lipidkomponenten standen spezifische Färbungen zur Verfügung, die eine selektive Darstellung ermöglichen (Cerebroside, Plasmalogene, Sphingomyelin). Bei verschiedenen Färbungen werden unterschiedliche Fettsäuren angefärbt, z. B. bei der sauren Haematein-Methode, Lezithin und Sphingomyelin. Da es jedoch derzeit keine selektive Färbung für Lezithin gibt, erlaubt gerade diese Färbung in Verbindung mit der NaOH-OTAN-Methode, bei der Sphingomyelin allein angefärbt wird, eine Beurteilung des Lezithins. Durch Erstellung eines Arbeitsplanes besteht die Möglichkeit, alle notwendigen Schritte für die Färbung zeitlich genau abzustimmen. Der überwiegende Teil der Ergebnisse liegt bereits nach vier Tagen vor. Die größte Verzögerung mit ca. 7-14 Tagen ergeben sich bei der Cholesterinfärbung, da hier die Schnitte zur Oxydation an der Luft in Formol schwimmen müssen. Gerade bei dieser Färbung bleibt zu prüfen, ob eine chromatographische Analyse differenziertere Ergebnisse speziell der Ester und der Triglyceride bringen kann.

Wie aus den aufgezeichneten Kurven ersichtlich, wurde meist eine deutliche Darstellung der Myelinscheide mit Transmissionsspitzen erreicht. Es wurden jedoch nicht alle Peaks verwertet, da z.T. auch interstitielles Fettgewebe mitgefärbt wurde, welches jedoch nie die Farbintensität des Myelins erreichte und z.T. Überlappungen im Präparat nicht vermieden werden konnten. Diese Peaks konnten jedoch ausgeschlossen werden, da durch das Fernglas am Photometer die Meßfläche und das Präparat betrachtet werden konnte, so daß eine Identifizierung des gemessenen Objektdetails jederzeit möglich war. Pro Nervenpräparat eines Schweines wurde für jede Färbung eine Kurve geschrieben und die Transmissionswerte ermittelt.

Die ausgesprochen starke Farbgebung der sauren Haematein-Methode (dunkelblau bis schwarz) ergab Transmissionswerte von 2-5%, mit nur geringen Schwankungen zwischen Axon und Myelin. Als einzige Färbung ist die Resorzin-Nitrit-Methode wegen zu starker Überlappung mit Verhärtung des Präparates photometrisch nicht auswertbar.

Vergleicht man die Meßwerte, die aus den Präparaten eines Schweinenervs erhalten wurden, mit denen verschiedener Schweine, so stimmen die Ergebnisse bei der Plasmalogenfärbung und der sauren Haematein-Methode überein. Lediglich der Mittelwert 30.5 ± 4.0 bei der PAS-Färbung nach Hotchkiss differiert geringfügig vom Standard mit 25.3 ± 2.3 , was jedoch wegen der Schwankungsbreite des gesamten Versuchsaufbaus toleriert werden kann.

Für diese Arbeit wurden nur Schweine verwertet, die von den Veterinärmedizinern ausgesucht und als gesund beurteilt wurden.

Zusammenfassung:

Es wurde die Möglichkeit geprüft, durch photometrische Auswertung histologischer Färbungen eine Abschätzung der Lipidkomponenten der Myelinscheide zu erreichen. Dazu wurden verschiedene Färbungen eingesetzt, die für einzelne Fettsäuren bzw. Fettsäuregruppen spezifisch sind. Untersucht wurden sowohl Nerven verschiedener frisch geschlachteter Schweine, als auch Nerven eines Schweines, die in ihrem Verlauf geschnitten und gefärbt wurden. Mit einem Photomultiplier wurden die Präparate im Mikroskop ausgewertet und mit einem Schreiber dokumentiert. Infolge des Streifenmusters der Präparate ergaben sich typische Transmissionsspitzen bei der Vermessung der gefärbten Myelinscheiden. bis auf die Gangliosid- und Cholesterin - Färbung, die zu große Strukturdefekte lieferten, erhielten wir bei allen anderen Färbungen gleichmäßige Ergebnisse. Durch computeranalytisch gesteuerte Auswertung könnte die Schwankungsbreite noch weiter eingeschränkt werden, sodaß eine direkte Korrelation zwischen der Extinction der spezifischen Färbung und den bereits bekannten Konzentrationen der jeweiligen Fettsäure in der Myelinscheide herzustellen möglich wäre. Dann bestünde zusätzlich zur histologischen Aussage über die Struktur auch die Möglichkeit einer histochemischen Konzentrationsangabe in einem Arbeitsgang.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) ADAMS, C.W.M.:
Histochemical mechanismus of the Marchi reaktion for
degeneration myelin.
J.Neurochemistry 2,178-186 (1958)
- 2.) ADAMS, C.W.M.:
A histochemical method for the simultaneous demonstra-
tion of normal and degenerating myelin.
J.Path.Bact. 77,648-650 (1959)
- 3.) ADAMS, C.W.M.:
Osmiumtetroxide and Marchi-method
Reaction with polar and non-polar Lipids, proteins and
polysaccarides
J.Histochem.Cytochem. 8,262-267 (1960)
- 4.) ADAMS, C.W.M. BAYLISS, O.B.:
The release of protein, lipid and polysaccharide components
of the arterial elastica by proteolytic enzymes and
lipid solvents.
- 5.) ADAMS, C.W.M. BAYLISS, O.B. IBRAHIM, M.Z.M.:
Modifications to histochemical methods for phosphogly-
cerid and cerebrosid.
J.Histochem.Cytochem. 11,560-561 (1963)
- 6.) ADAMS, C.W.M. DAVISON, A.N.:
The histochemical identification of myelin phosphogly-
cerids by their ferric hydroxamates.
J.Neurochem. 3,347-351 (1959)
- 7.) ALBERT, S. LEBLOND, C.P.:
The distribution of Feulgen and 2.4 dinitrophenylhydrazin-
reaction.
Endokrinology 39,386-400 (1946)
- 8.) BAKER, J.R.:
The histochemical recognition of Lipine.
Quart.J.micr.Sci. 87,441-470 (1946)
- 9.) BAKER, J.R.:
The structure and chemical composition of the Golgi element.
Quart.J.Sci. 85,175 (1944)
- 10.) BAKER, J.R.:
Further remarks on the histochemical recognition of Lipine.
Quart.J.mirc.Sci.88,463-465 (1947)
- 11.) BERG, N.O.:
A histochemical study of masket lipids.
Acta path.microbiol.scand. 90, Suppl.1-192 (1951)

- 12.) BISCHOFF, A.:
New morphologic and pathogenetic aspects of diabetic neuropathy. Electron microscopic observations.
Diabetes, Proceed.Sixth Congr.Internat.Diab.Feder.
Excerpta Medica Foundation Amsterdam 1969, S.627-632
- 13.) BOEMINGHAUS, H.:
Über den Wert der Nilblaumethode für die Darstellung der Fettsubstanzen und den Einfluß einer längeren Formalinfixierung auf den Ausfall der Färbung.
Beitr. path.Anat. 67,533-538 (1920)
- 14.) BRANTE, G.:
Studies on lipids in the nervous system.
Acta physiol.scand. 18,Suppl.63 (1949)
- 15.) BRANTE, G.:
Gargoylismus als Lipoidose.
Fette und Seifen 53,457-461 (1951)
- 16.) CAIN, A.J.:
The use of Nile blue in the examination of lipids.
Quart.J.micr.Sci. 88,383 und 467 (1947)
- 17.) CAIN, A.J.:
On the significance of the plasmal reaction.
Quart.J.micr.Sci. 90,75-86 (1949)
- 18.) CASSELMANN, W.G.B.:
Observations concerning the specificity of the acid haemateintest for phospholipids.
Quart.J.micr.Sci. 93,381-383 (1952)
- 19.) CLARA, M.:
Histochemische Untersuchungen an den Körnchen in den basalkörnigen Zellen des Darmepithels.
Z.Zellforsch. 15,801-808 (1932)
- 20.) CHRISTENSEN, N.J.:
Vibratory perception and blood flow in the feed of diabetics.
Acta med.scand. 185,553 (1969)
- 21.) DA ROCHE LIMA, H.:
Zur pathologischen Anatomie des Gelbfiebers.
Verh.dtsch.Ges.path. 15,163-182 (1912)

- 22.) DAVISON, A.N. WAJDA, M.:
Analysis of lipids from fresh and preserved adult human brain.
Biochem. J. 82,113-117 (1962)
- 23.) DIETRICH, A.:
Zur Differentialdiagnosé der Fettsubstanzen.
Verh.dtsch.path.Ges. 14,263-268 (1910)
- 24.) FEIGIN, I.
Xanthomatosis of nervous system.
J.Neuropath.Exper.Neurol. 15,400-416 (1956)
- 25.) FEIGIN, I. CRAVIOTO, H.:
A histochemical study of myelin. A difference in the solubility of the glukolipid components in the central and peripheral nervous system.
J.Neuropath.Exp.Neurol. 20,245-254 (1961)
- 26.) DIEZEL, A.:
Die Stoffwechselstörungen der Sphingolipide, eine histochemische Studie an den primären Lioidosen.
- 27.) FEYRTER, F.:
Über chromotrope Lipide und Lipoproteine.
Wien.klin.Wschr. 55,461-463 (1942)
- 28.) GALLAYS, F.:
The histochemical identification of phosphoglycerides in myelin.
J.Neurochem. 10,125 (1963)
- 29.) GERARD, P.:
Sur la reaction plasmal.
Bull.Hist.appl. 12,274-278 (1935)
- 30.) GREGERSEN, G.:
Vibratory perception thershold and motor conduction velocity in diabetic and non-diabetics.
Acta med.scand. 183,61 (1968)
- 31.) HAMMAR, J.A.:
Beiträge zur Konstitutionsanatomie.
Z.mirc.anat.Forsch. 1,85-190 (1925)
- 32.) HAYES, E.R.:
The plasmal reaction.
Anat.Rec. 97,391 (1947)
- 33.) HOTCHKISS, R.D.:
A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations.
Arch.Biochem. 16,131-141 (1948)

- 34.) JOHNSON, A.C. MC NABB, A.R. ROSSITER, R.J.:
Chemical studies of peripheral nerve during Wallerian
degeneration.
Biochem.J. 45,500-508 (1949)
- 35.) KHAN, A.A. RIEMERSMA, J.C. BOOJI, H.L.:
The reaction of osmium tetroxide with lipids and other
compounds.
J.Histochem.Cytochem. 9,560-563 (1961)
- 36.) KIMMELSTIEL, P.:
Erfahrungen mit der Schulz'schen Cholesterinreaktion.
Zbl.allg.Path.path.Anat. 36,491-493 (1925)
- 37.) KIMMELSTIEL, P.:
Über den Einfluß der Formalinfixierung von Organen auf
die Extrahierbarkeit der Fette.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 184,143-146 (1929)
- 38.) KLENK, E.:
Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen
Gehirnlipiden.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 273,76-86 (1942)
- 39.) KLENK, E. DEBUCH, H.:
Zur Kenntnis der Acetalphosphatide.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 296,179-188 (1954)
- 40.) KLENK, E. DEBUCH, H.:
The lipids.
Ann.Rev.Biochem. 28,39-68 (1959)
- 41.) KLENK, E. LANGEBEINS, H.:
Mikromethode zur quantitativen Bestimmung der Ganglioside.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 290,169-171 (1941)
- 42.) KOCH, W. KOCH, M.L.:
Contribution of the chemical differentiation of the
central nervous system.
J.biol.Chem. 15,267-279 (1913)
- 43.) KUTSCHERA-AICHBERGEN, H.:
Über die Lipide in der arteriosclerotische Gefäßwand.
Klin.Wsch. 4 654-664 (1955)

- 44.) LENNERT, K.:
Die Histochemie der Fette und Lipide.
Z.wiss.Mikr. 62,368-393 (1955)
- 45.) LISON, P.:
Progrès récents de l'histochemie quantitative.
Ann.Soc.roy.Sci.med.nat.BruX. 3,154-168 (1953)
- 46.) LILLIE, R.D.:
Histopathological technic and practical Histochemistry.
Seite 309, New York (1954)
- 47.) MLADENOVIC, C. LIEB,H.:
Über den Einfluß der Formalinfixierung auf die Extrahier-
barkeit der Fette.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 184,221-226 (1929)
- 48.) NORTON, W.T. KOREY, S.R.:
Proc.VI Intern.Congress Neuropathology.
in H.Jakob (Ed.) vol 1, Seite 227 Stuttgart (1962)
- 49.) PEARSE, A.G.E.:
The histochemical demonstration of keratin methods
involving selective oxidation.
Quart.J.micr.Sci. 92,393-402 (1951)
- 50.) PEARSE, A.G.E.:
Histochemistry, Theoretical and Applied.
1.Auflage, Seite 178, London (1953)
- 51.) PISCHINGER, A.:
Der Formaldehyd als Ursache für die besonderen Erscheinun-
gen bei der Einschlußfärbung (Feyrter).
Z.micr.anat.Forsch. 50,590-612 (1943)
- 52.) PLENERT, W.:
Der Bakertest bei der Untersuchung des subkutanen Fett-
gewebes im Kindesalter.
Acta histochem. (Jena) 8,311-324 (1959)
- 53.) RENNKAMP, F.:
Struktur der Sphingomyeline.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 284,215-228 (1949)

- 54.) ROMEIS, B.:
Mikroskopische Technik.
15.Auflage, 695 S.R. Oldenburg, München
- 55.) ROSSITER, R.J.:
Chemical Pathology of the nervous-system
J.Folch (Ed.) p. 207, Oxford (1961)
- 56.) ROULET, F.:
Methoden der pathologischen Histologie.
Wien (1948)
- 57.) SCHARF, J.H.:
Untersuchungen über Nervenlipoide.
Acta Neuroveg. 4,31-62 (1952)
- 58.) SCHMIDT, W.J.:
Doppelbrechung und Feinbau der Markscheide der Nerven-
faser.
Z.Zellforsch. 23,657-676 (1936)
- 59.) SCHMITT, F.O.:
Metabolism of the nervous system.
in D.Richter (Ed.) Seite 35, New York (1957)
- 60.) SCHMITT, F.O. BEAR, R.S. PALMER, K.J.:
X-ray diffraction studies on structure of the nerve
myelin sheath.
J.Cell.and Com.Physiol. 18,31-42 (1941)
- 61.) SHEAR, M. PEARSE, A.G.E.:
A direct histochemical method for the demonstration of
sialic acid.
Nature (London) 198,1273-1275 (1963)
- 62.) SMITH, J.L. MAIR, W.:
The application of Weigert's myelin method to the
staining of fats.
J.Path.Bact. 12,134 (1908)
- 63.) STAVELY, H.E. BERGMANN, W.:
Photoactivity of irradiated cholesterol, pseudo-photo-
graphic effect.
Am.J.Cancer 30,749-752 (1936-1937)
- 64.) STEINER, I.B.:
Diabetic neuropathy. Vibration sense and abnormal tendon
reflexes in diabetics.
Acta med. scand. 173,394 (1963)

- 65.) WEBER, C. PHILLIPS, G. BELL, P.:
An improved method for the Schultz cholesterol test.
J.Histochem.Cytochem. 4.308 (1956)
- 66.) WEIL. A.:
The influence of formalin Fixation on the lipids of
the central nervous system.
- 67.) WÜSTENFELD, E.:
Experimentelle Beiträge zur Frage der Volumenänderung
und Eindringdauer in der histologischen Technik.
I. Mitt.Z.w.M. 62, 241-247 (1954/55)
- 68.) ZUGIBE, F.T. PEPINE, C. BELL, P.JR. et,al.:
Shear and Pearse method for direkt histochemical
demonstration of sialic acid.
Nature (London) 201,630-631 (1964)

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 22.Juli 1950 als Sohn des Elektromeisters Peter Schwalbach und seiner Frau Gisela, geb. Dalheimer, in Völklingen/Saar geboren.

Dort besuchte ich die Volksschule, anschließend das Realgymnasium in Dillingen/Saar und legte das Abitur im Frühjahr 1969 ab.

Danach verpflichtete ich mich als Zeitsoldat bei der Bundeswehr. Ich hatte bereits während meiner Dienstzeit die Möglichkeit, an der Universität München immatrikuliert zu sein.

Die Ärztliche Vorprüfung legte ich im Aug.1974, den I.Teil der Ärztlichen Prüfung im Aug.1975, den II.Teil der Ärztlichen Prüfung im Aug.1977 ab.

Nach Absolvierung des Praktischen Jahres (1. Trimester : Orthopädische Universitätsklinik; 2. Trimester : I.Med. Klinik Großhadern; 3. Trimester : Chirurgische Klinik Neuperlach) habe ich den schriftlichen Teil des III. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 10.Okt.1978 und den mündlichen Teil am 9.Nov.1978 in München erfolgreich bestanden.

Die Approbation als Arzt wurde mir am 27.Nov.1978 erteilt. Anschließend vertrat ich bis Feb.1979 niedergelassene Kollegen in freier Praxis.

Seit März arbeitete ich in der Knappschaftsambulanz in Penzberg, was als Weiterbildungszeit in Allgemeinmedizin anerkannt wird.

Seit dem 15.Okt.1979 arbeite ich als niedergelassener Landarzt in Pürgen.

